

表皮分化に必要なイネの *ONION2* 遺伝子の新たな突然変異体の同定と次世代への遺伝Identification of new mutant alleles of *ONION2* required for epidermis development in rice and its inheritance

益子恵利那^{1,2}, 山田桂一^{1,3}, 小松陽花^{1,4}, 佐藤菜々^{1,5}, 鈴木悠世^{1,6}, 小川裕美佳^{1,7}, 岩田紗也加^{1,8}, 佐藤優花里^{1,9}, 藤倉理帆^{1,9}, 佐藤知美^{1,4}, 佐々木長将^{1,10}, 高橋佑輔^{1,11}, 高橋宏輔^{1,11}, 佐久間仁徳^{1,8}, 我妻孝樹^{1,6}, 山本楽人^{1,12}, 佐久間結菜^{1,13}, 川口倫央^{1,5}, 高橋ほなみ¹⁴, 石橋まゆ¹⁴, 久慈正義¹⁴, 伊藤幸博^{1,14}

MASUKO Erina^{1,2}, YAMADA Keiichi^{1,3}, KOMATSU Haruka^{1,4}, SATO Nana^{1,5}, SUZUKI Yusei^{1,6}, OGAWA Yumika^{1,7}, IWATA Sayaka^{1,8}, SATO Yukari^{1,9}, FUJIKURA Riho^{1,9}, SATO Tomomi^{1,4}, SASAKI Naganobu^{1,10}, TAKAHASHI Yusuke^{1,11}, TAKAHASHI Kosuke^{1,11}, SAKUMA Masanori^{1,8}, YAMAMOTO Gakuto^{1,12}, WAGATSUMA Kouki^{1,6}, SAKUMA Yuna^{1,13}, KAWAGUCHI Rio^{1,5}, TAKAHASHI Honami¹⁴, ISHIBASHI Mayu¹⁴, KUJI Seigi¹⁴, ITO Yukihiro^{1,14}

(Received: 11 December 2019; Accepted: 9 January 2020; Released: 18 February 2020)

東北大学 科学者の卵養成講座¹, 前橋育英高等学校², 群馬県立前橋高等学校³, 宮城県宮城第一高等学校⁴, 仙台白百合学園高等学校⁵, 山形県立米沢興譲館高等学校⁶, 秋田県立秋田高等学校⁷, 福島県立福島高等学校⁸, 岩手県立一関第一高等学校⁹, 岩手県立釜石高等学校¹⁰, 山形県立山形東高等学校¹¹, 福島県立相馬高等学校¹², 岩手県立花巻北高等学校¹³, 東北大学大学院農学研究科¹⁴

EGGS, Tohoku University¹, Maebashi Ikuei High School², Maebashi High School³, Miyagi First Senior High School⁴, Sendai Shirayuri Gakuen High School⁵, Yonezawa Kojokan High School⁶, Akita High School⁷, Fukushima High School⁸, Ichinoseki Daiichi Senior High School⁹, Kamaishi High School¹⁰, Yamagata East Senior High School¹¹, Soma High School¹², Hanamaki Kita High School¹³, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University¹⁴

Corresponding Author's e-mail: yukito@tohoku.ac.jp

【要約】

植物の表皮は、環境ストレスから植物を守る重要な組織である。本研究では、イネの表皮分化の遺伝的仕組みを明らかにすることを目的にイネの表皮分化の突然変異体の選抜と原因遺伝子の同定を行った。既知のイネの表皮分化の突然変異体と同様なシュートの形態異常を示す突然変異体を選抜し、そのクチクラの構造を調べたところ、クチクラの突起の形成が不十分であることが分かった。また、最外層細胞のマーカー遺伝子の発現も低下しており、表皮の分化が正常に起こっていないと考えられた。遺伝子マッピングを行ったところ、突然変異の原因遺伝子は第10染色体に座乗する *ONION2* (*ONI2*) 遺伝子の近傍に存在することがわかった。そこで、突然変異体の *ONI2* 遺伝子の構造を調べたところ、第1エキソンがPCRにより増幅されず、大きな欠失、挿入や逆位などの変異が起こっていると考えられた。以上の結果、この突然変異体は *ONION2* 遺伝子の新たな突然変異体であることが分かった。さらに、*oni2* ヘテロ株の自殖次世代での分離比を調べたところ、*oni2* 変異アレルの次世代への伝達率が低いことがわかった。*ONI2* は表皮分化に加え、配偶子の発生や受粉過程でも機能していることが考えられた。

【キーワード】 突然変異体、遺伝子同定、表皮、メンデルの法則、イネ

Mutant, Gene identification, Epidermis, Mendel's Laws of Inheritance, Rice

1. はじめに

植物の表面は表皮細胞で覆われており、表皮細胞の外側にはクチクラ層が形成されている。クチクラ層はクチンおよびワックスからなり、乾燥、紫外線、病原菌などの環境ストレスから植物を守る役割を果たしている。植物の表皮は、環境ストレスから植物を守る重要な組織であるだけでなく、気孔を形成する孔辺細胞、受粉に関わる乳頭細胞など、植物の

生育や繁殖にも関わる重要な細胞も分化する。また、植物ホルモンの重要な情報伝達の場となっていることも知られている (Savaldi-Goldstein et al 2007, Gallavotti et al 2008, Miyashita et al 2010)。

これまでの研究で、植物の表皮の分化に必要な遺伝子がいくつか同定されている。シロイヌナズナでは、転写制御因子をコードする *ATML1*、*PDF2* の突然変異体では正常な表皮分化

が見られない (Abe et al 2003)。また、これらの遺伝子を強制的に発現させるとその細胞が表皮に分化することから、表皮分化のマスタースイッチとなる遺伝子と考えられている (Takada et al 2013)。また、受容体型プロテインキナーゼ遺伝子 *ACR4*, *ALE2* や分泌型のタンパク質分解酵素をコードする遺伝子 *ALE1* の突然変異体も正常な表皮分化が見られなくなり、細胞膜を介したシグナル伝達が表皮分化に重要であると考えられている (Tanaka et al 2001, Tanaka et al 2002, Tanaka et al 2007)。

イネにおいては、これまでに3つの表皮分化に関わる遺伝子、*ON1QNI* (*ON1*)、*ON12* および *ON13* が同定されている (Ito et al 2011, Tsuda et al 2013, Akiba et al 2014)。これらの遺伝子の突然変異体では正常な表皮が見られず、隣接する器官の融合が見られる。また、実生致死でもある。*ON1* および *ON12* は極長鎖脂肪酸合成酵素の1つである ketoacyl CoA synthase をコードしており、*oni1* 突然変異体および *oni2* 突然変異体では実際に極長鎖脂肪酸量が減少している (Ito et al 2011, Tsuda et al 2013)。また、*ON13* は長鎖脂肪酸の ω 末端を酸化する反応を触媒する long-chain fatty acid omega alcohol dehydrogenase をコードしているが、*oni3* 突然変異体においても極長鎖脂肪酸量の低下が報告されている (Akiba et al 2014)。さらに、*oni1*, *oni2*, *oni3* 突然変異体では、いずれも脂質の組成に異常が見られる (Ishikawa et al 2016)。従って、極長鎖脂肪酸あるいは極長鎖脂肪酸から合成される脂質が表皮分化に重要な役割を果たしていると考えられている。

このように、表皮分化に関わるいくつかの遺伝子は知られてはいるものの、その遺伝的制御機構の全体像は明らかにされていない。例えば、転写制御因子、受容体型プロテインキナーゼ、脂肪酸/脂質がどのように表皮分化を制御しているか、あるいはこれら3つの異なる分子/シグナル伝達系の中に相互作用があるのか、もしあるならどのように相互作用しているのかなど、多くの明らかにすべき問題が残されている。

本研究では、イネの表皮分化の遺伝的仕組みを明らかにすることを目的に、イネの表皮分化に異常を示す新たな突然変異体の同定を行った。その結果、*ON12* の新しい突然変異体を同定することができた。さらに、*oni2* 変異アレルの次世代への伝達率が低いことから、*ON12* は表皮分化に加え、配偶子の発生や受粉過程でも機能していると考えられた。

2. 実験方法

(1) 材料

イネゲノムリソースセンターの *Tos17* ミュータントパネル (<https://tos.nias.affrc.go.jp>) から分譲された系統である ND4073 および ND4084 を用いた。これらはヘテロ株として維持し、ヘテロ株自殖種子に含まれる突然変異体を実験に用いた。また、これらの系統の親品種である日本晴を野生型として用いた。また、自殖次世代の分離比解析には、*oni2-1*

(Tsuda et al 2013) を用いた。

(2) 走査型電子顕微鏡観察

発芽10日目のイネの葉鞘を用いた。イネ葉鞘は凍結乾燥し、白金パラジウムでコーティングし、走査型電子顕微鏡 (Hitachi SU8000) を用いて観察した。

(3) 遺伝子発現解析

野生型および突然変異体のシュートからグアニジンチオシアネート法により RNA を抽出した。5 μ g の全 RNA から Dynabeads (サーモフィッシュサイエンティフィック) を用いて poly(A)⁺RNA を精製した。poly(A)⁺RNA は oligo(dT) および SuperScript III Reverse Transcriptase (サーモフィッシュサイエンティフィック) を用いて逆転写を行った。逆転写して得られた cDNA は PCR の鋳型として用いた。PCR は、遺伝子特異的プライマーおよび ExTaq (タカラバイオ) を用いて行った。プライマーの配列は表1に示した。コントロールにはアクチン遺伝子 (Os03g0718100) を用いた。

(4) 遺伝子マッピング

ND4073 および ND4084 のヘテロ株をそれぞれインディカ品種カサラスと交配して得られた F₂ 世代を用いた。突然変異体および野生型の形態を示す個体から DNA を抽出し、SSR マーカーおよび CAPS マーカーを計48個用いた。

表1 用いたプライマーの配列

遺伝子	プライマー	塩基配列
<i>ON12</i>	ON12-F5	5'-CGCTTCGGCAACACGCTCCAG-3'
	ON12-F6	5'-ATTGCTCCCATACCTTCCTC-3'
	ON12-F7	5'-GGAGGTAGTACCTATCAGTG-3'
	ON12-F8	5'-GAGAAGAGAGAGGAGGTGAG-3'
	ON12-R4	5'-CTTTGGACCATTGTGTGAGTG-3'
	ON12-R5	5'-AAGCAGCCTAGCAATGGCTC-3'
	ON12-R6	5'-CTCCAGAGGATGCAGTACAG-3'
<i>OsIAA7</i>	IAA7-F1	5'-GATGGTGCCCTATTGGTAG-3'
	IAA7-R1	5'-CAACTACTCAGCAGCTGTTCT-3'
<i>OsIAA14</i>	IAA14-F1	5'-CACTTCGCGCTCGCTATGA-3'
	IAA14-R1	5'-CCGATCCAACCTGAATCCTGA-3'
<i>OsPIN3a</i>	PIN3a-F1	5'-TCCATGCCAGCAATCGTCGA-3'
	PIN3a-R1	5'-GTCCAAGAAGGATGTAGTAC-3'
<i>OsPIN5a</i>	PIN5a-F1	5'-TCCGCGTCCGCATCATAACAG-3'
	PIN5a-R1	5'-CATAGAACTCGATACTCCCA-3'
<i>RAc1</i> (actin)	RAc-1	5'-AACTGGGATGATATGGAGAA-3'
	RAc-2	5'-CCTCCAATCCAGACTGTGA-3'
<i>ROC1</i>	ROC1-F1	5'-TAGTAGCACCCTTCAACC-3'
	ROC1-R1	5'-CAGACAACACATCACAACAG-3'

oni2 遺伝子の増幅は、ND4073 および ND4084 のゲノム DNA を鋳型とし、ONI2-F8 と ONI2-R6 および ONI2-F7 と ONI2-R5 のプライマーの組み合わせを用いた PCR により行った (表 1)。PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動を行った。

(5) 塩基配列解析

上記の PCR 産物の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、DTCS Quick Start Master Mix (ベックマンコールター) と DNA シーケンサー CEQ8000 (ベックマンコールター) を用いた。

(6) 分離比解析

ONI2 突然変異体ヘテロ株の自殖種子を約 1,000 粒播種し、発芽 2 週間後に目視により表現型での分離比を調べた。

また、遺伝子型による分離比解析のため、新たに約 200 粒播種し、2 週間後に DNA を抽出した。DNA 抽出は、発芽した個体だけではなく、発芽しなかった種子も含め、播種したすべての個体から行った。*oni2-1* の突然変異体では 16 bp の欠失がみられる (図 1)。この欠失を含む領域を ONI2-F5 と ONI2-R7 のプライマー (表 1) の組み合わせで PCR により増幅した。

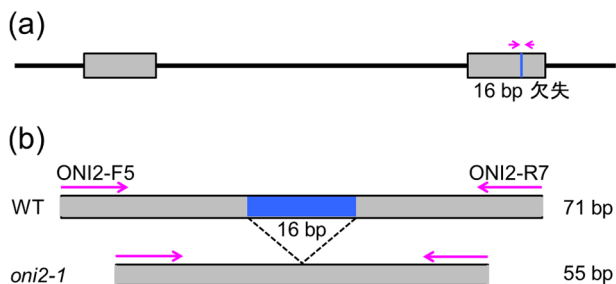


図 1 *ONI2* 遺伝子の構造とプライマーの位置

(a) *ONI2* 遺伝子の構造。(b) *ONI2* を増幅するプライマーの位置。グレーのボックスはコード領域を示し、青は *oni2-1* で欠失している領域を示す。矢印はプライマーの位置を示す。

3. 結果と考察

(1) 表皮分化の突然変異体の同定

イネの表皮分化の突然変異体は、単に表皮が正常に分化できないだけでなく、シュート全体が大きく影響を受け、タマネギのような形態を形成し、実生致死となることが報告さ

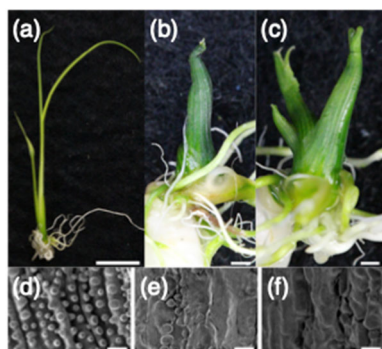


図 2、ND4073 と ND4084 の表現型

(a) 野生型、(b) ND4073、(c) ND4084、(d) 野生型の SEM、(e) ND4073 の SEM、(f) ND4084 の SEM、バー: (a) 1 cm、(b) (c) 1 mm、(d) (e) (f) 10 μm。

れている (Akiba et al 2014, Ito et al 2011, Tsuda et al 2013)。そこで、新たなイネの表皮分化の突然変異体を同定するため、既知の突然変異体と同様なシュートの形態異常を示す突然変異体を選抜した。選抜は、*Tos17* ミュータントパネル (<https://tos.nias.affrc.go.jp>) に表示されるイネの写真の基に行い、その後、分譲された種子を用いて確認した。その結果、ND4073 および ND4084 の 2 つの系統を選抜した (図 2 a~c)。これら 2 つの突然変異体は、既知の表皮分化の突然変異体 (*onion* 変異体) とよく類似したシュートの形態異常を示した。*onion* 変異体ではクチクラの構造に異常が見られる (Akiba et al 2014, Ito et al 2011, Tsuda et al 2013)。そこで、ND4073 および ND4084 のクチクラの構造を走査型電子顕微鏡で調べた。その結果、いずれの突然変異体でもクチクラの突起が正常に形成されていないことがわかった (図 2 d~f)。また、最外層細胞のマーカー遺伝子である *ROCI* (Ito et al 2002) の発現を調べたところ、*ROCI* の発現が低下していることがわかった (図 3a)。また、茎頂では表皮が主要なオーキシン極性輸送の場となっており、*onion* 突然変異体ではオーキシン関連遺伝子の発現に異常が見られることが報告されている (Akiba et al 2014, Takasugi and Ito 2011, Tsuda et al 2013)。そこで、*onion* 突然変異体で発現異常の見られたオーキシン関連遺伝子の発現を調べた。*OsPIN3a* および *OsPIN5a* はオーキシン極性輸送遺伝子であり、*OsIAA7* および *OsIAA14* はオーキシンに応答して発現誘導される遺伝子である (Miyashita et al 2010, Jain et al 2006)。qRT-PCR の結果、ND4073 および ND4084 でもこれらの遺伝子の発現が影響を受けていることがわかった (図 3b, c)。以上の結果から、ND4073 および ND4084 は表皮分化の突然変異体であると考えられた。

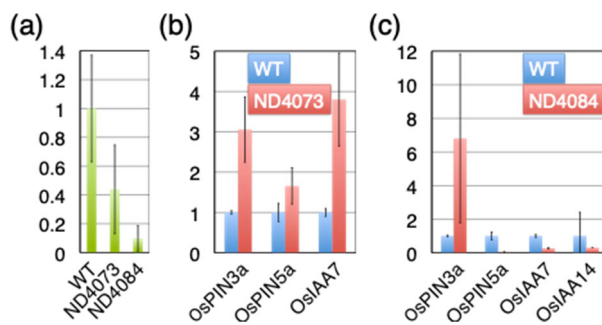


図 3 マーカー遺伝子の発現

(a) *ROCI* の発現。(b) ND4073 におけるオーキシン関連遺伝子の発現。(c) ND4084 におけるオーキシン関連遺伝子の発現。野生型での発現レベルを 1 とした相対値で表す。

(2) 原因遺伝子の同定

カサラスと交配して得られた F₂ を用いて ND4073 および ND4084 の原因遺伝子のマッピングを行った。イネ全染色体に散らばった 48 個のマーカーを調べたところ、第 10 染色体の

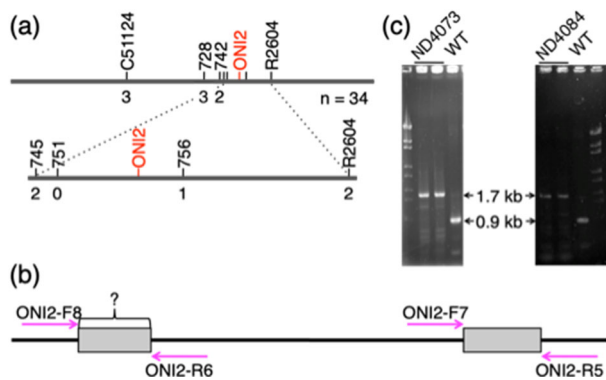


図4 ND4073 および ND4084 の原因遺伝子のマッピング

(a) マッピング。数字は組換え染色体数を示す。(b) *ONI2* の構造とプライマーの位置。グレーのボックスはエクソンを示す。マゼンタの矢印はプライマーの位置を示し、? は PCR での増幅を阻害する変異を示す。(c) PCR による *ONI2* の第 1 エキシンの増幅。

マーカー-R2604 と連鎖していることがわかった (図 4a)。そこで、このマーカーの近辺に新たにマーカーを設計してマッピングを行ったところ、マーカー-KNJ8-indel1745 (図 4a の 745) とマーカー-KNJ8-indel 756 (図 4a の 756) の間に原因遺伝子が座乗することがわかった (図 4a)。この領域には、*ONI2* が存在する。そこで、ND4073 の *ONI2* の塩基配列を調べた。*ONI2* は 2 つのエクソンからなる (図 4b)。第 1 エクソン全体を増幅するプライマーの組み合わせ (ONI2-F8 と ONI2-R6) で PCR を行ったところ、日本晴からは予想される約 800 bp のバンドが増幅されたが、ND4073 からは野生型より約 800 bp 長い約 1.6 kb のバンドが増幅された (図 4c)。このバンドは片方のプライマー (ONI2-F8) だけで同じサイズのバンドが増幅され、非特異的な増幅と考えられた。そこで、新たなプライマーの組み合わせ (ONI2-F10 と ONI2-R6) を用いて PCR を行ったが、ND4073 からは特異的なバンドの増幅は見られなかった。第 2 エクソンを PCR で増幅した場合は、予想される長さのバンドが増幅され、塩基配列に変異も見られなかった。以上の結果、ND4073 の *ONI2* には、PCR による増幅を阻害する長い DNA 断片の挿入や欠失、逆位などの大きな変異が存在すると考えられた。

ND4084 にも ND4073 と同様、第 1 エクソンを増幅するプライマーの組み合わせ (ONI2-F8 と ONI2-R6) では予想される長さより約 800 bp 長い、1.6 kb のバンドの増幅が見られ (図 4c)、このバンドも片方のプライマー (ONI2-F8) だけによるものであった。しかし、ND4073 とは異なり、ONI2-F10 と ONI2-R6 の組み合わせでは野生型と同じ長さのバンドの増幅が見られた。以上の結果、ND4083 の *ONI2* 遺伝子にも PCR での増幅を阻害するような大きな変異が挿入されているものの、ND4073 とは異なる変異であると考えられた。

以上の結果、2 つの新たな突然変異体はいずれも *ONI2* の突然変異体 (*oni2-3*、*oni2-4*) であると考えられた。これまでに知られている *oni2* 突然変異体のうち *oni2-1* には第 2 エキ

ソンに 16 bp の欠失が見られ、*oni2-2* では第 1 エクソンに PCR による増幅を妨げる変異が入っていることが報告されている (Tsuda et al 2013)。*oni2* 突然変異体はいずれも培養により変異が導入されており、これらのことを考えると、*ONI2* の第 1 エクソンは、培養により大きな変異が起こりやすい領域である可能性が考えられた。

(3) *oni2* 変異アレルの次世代への伝達効率

oni2 のマッピングの過程でカサラスとの F₂ を播種すると、突然変異体の出現頻度がメンデルの法則から予想される 25% より低い傾向が見られた。そこで、*oni2* ヘテロ株の自殖種子約 1,000 粒を播種し、2 週間後に発芽した個体を野生型と突然変異体に分別し、それぞれの数を数えた。その結果、野生型が 769 個 (78.8%)、突然変異体が 207 個 (21.2%) であり、突然変異体の出現頻度がメンデルの法則から予想される 25% より低かった (表 2)。 χ^2 検定を行った結果、 χ^2 値 = 7.48087432、p-値 = 0.00623578 (自由度 = 1) となり、野生型 : 突然変異体 = 3:1 の分離比とは 1%水準で有意に突然変異体の出現率が低いことがわかった。

表 2 表現型による分離比

野生型		<i>oni2</i>	
個体数	割合 (%)	個体数	割合 (%)
769	78.8	207	21.2

次に PCR による遺伝子型の判別を行った。*oni2* ヘテロ株の自殖種子 197 個を播種し、まず、表現型による分別を行った。その結果、野生型が 112 個、突然変異体が 48 個、不発芽が 37 個であった。野生型には、野生型の種子を播種したときにも見られる生育が不全なシュートを形成するものも含めた。

次に、発芽しなかった種子を含め、播種したすべての個体から DNA を抽出し、遺伝子型の判別を行った。本研究で用いた *oni2* 突然変異体は *oni2-1* であり、*ONI2* に 16 bp の欠失が見られる (Tsuda et al 2013)。そこでこの 16 bp の欠失を含む領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行った (図 1)。野生型の遺伝子からは 71 bp の長さのバンドが増幅し、突然変異遺伝子からは 55 bp の長さのバンドが増幅される。野生型の長さのバンド (71 bp) のみが見られた場合を野生型ホモ株、突然変異遺伝子の長さのバンド (55 bp) のみが見られた場合を突然変異ホモ株、両方のバンド (71 bp と 55 bp) が見られた場合をヘテロ株とした。

PCR による DNA の増幅が見られた 189 個体の遺伝子型を調べた結果、野生型ホモ株が 51 個 (27.0%)、ヘテロ株が 97 個 (51.3%)、突然変異ホモ株 41 個 (21.7%) であった (表 3)。遺伝子の出現頻度で表すと、野生型アレルが 52.6%で、突然変異アレルは 47.4%であった。

表3 遺伝子型による分離比

野生型ホモ		ヘテロ		<i>oni2</i> ホモ	
個体数	割合 (%)	個体数	割合 (%)	個体数	割合 (%)
51	27.0	97	51.3	41	21.7

表現型が野生型と判断されたものは、1個体を除き、すべて野生型ホモかヘテロの遺伝子型を示した。*oni2*ホモの遺伝子型を示した1個体は、小さな生育不良のシュートを形成した個体であり、本来 *oni2* の表現型を示すはずであったが、生育不良が重なったため *oni2* の表現型とは判別できない形態になり、野生型に分別されたと考えられた。表現型が *oni2* 突然変異体と判別された個体は、すべて *oni2*ホモの遺伝子型を示した。発芽しなかった種子の遺伝子型は、野生型ホモが11個 (42%)、ヘテロが13個 (50%)、突然変異ホモが2個 (8%) であった。

oni2 は劣性の突然変異であり、メンデルの法則から *oni2* ヘテロ株の自殖種子は25%が *oni2* 突然変異体の表現型を示すはずである。しかし、約1,000個体の表現型を調べたところ、実際には21.2%しか *oni2* の表現型を示さなかった (χ^2 検定で1%水準で有意差あり、表2)。この原因として、以下の3つの可能性が考えられた。(1) *ONI2* は花粉の形成や受粉過程においても機能しており、*oni2* が変異した花粉は最終的に受精に至る確率が低くなる、(2) *ONI2* は胚発生や発芽に影響しており、*oni2*ホモの種子は発芽率が低下し、表現型の判別から除去された、(3) 遺伝的浸透度が100%ではなく、遺伝子型が *oni2*ホモでも低頻度で野生型の表現型を示す。これらの可能性のうち、(2)の場合は、不発芽種子のうち突然変異体ホモの遺伝子型を示す個体の割合が *oni2* 突然変異体の出現頻度が減少する分だけ上昇し、メンデルの法則から予想される25%より高くなるはずである。しかし、*oni2*ホモの遺伝子型を示した個体はサンプル数が少ないものの8%しかなく、この可能性は否定された。(3)の場合は、表現型が野生型の個体でも遺伝子型が *oni2*ホモを示す個体が現れるはずである。しかし、そのような個体は、生育不良のため正確に表現型を判別できなかった1個体以外みられず、この可能性も否定された。一方、(1)の場合は、*oni2* 突然変異アレルが次世代に伝達される確率が低下するため、次世代での *oni2* 突然変異アレルの出現頻度が低下するはずである。遺伝子型解析を行った結果、*oni2* 突然変異アレルの次世代における出現頻度が47.4%とメンデルの法則から予想される50%より低く、さらに *oni2*ホモの株の出現頻度もメンデルの法則から予想される25%より低い21.7%であり、この可能性と矛盾しない結果が得られた。また、*ONI2* は生殖器官でも発現しており、特に雄性生殖器官での発現が高く、発生過程を通して恒常的に発現している (Fujita et al 2010, Rice X Pro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp>))。この発現パターンは、

ONI2 が生殖細胞の発生や受粉過程で何らかの機能を果たしていることを示唆しており、(1)の可能性を支持している。さらに表皮ワックスに異常が見られ、脂肪酸や脂質の生合成に関わると考えられるシロイヌナズナの *eceriferum* (*cer*) 突然変異体でも稔性の低下が報告されている (Koornneef et al 1989)。例えば CER1 と CER3 は複合体を形成し極長鎖アルカンの合成を触媒するが、これらの突然変異体では、低湿度条件下で花粉の稔性が低下することが報告されている (Aarts et al 1995, Bernard et al 2012)。これらのことも(1)の可能性を示唆しており、*ONI2* は花粉の形成や受粉過程でも機能していると考えられた。

4. 結論

本研究では、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子 *ONI2* の新たな突然変異体 *oni2-3* および *oni2-4* を同定した。これらの突然変異体は既知の *oni2* 突然変異体と同様に小さなシュートを形成し、実生致死となった。さらに、表皮の上に形成されるクチクラの突起の異常、表皮を含む最外層細胞のマーカー遺伝子の発現低下、オーキシン関連遺伝子の発現異常が見られ、表皮が正常に分化していないことがわかった。

また、花粉は、脂質や脂肪酸を多く含んでおり、*ONI2* が機能を失ったことで花粉に何らかの不具合が生じたものと考えられる。*ONI2* は表皮分化だけでなく、生殖過程でも何らかの機能を持っており、これらの過程でも極長鎖脂肪酸が重要な機能を果たしていることが考えられた。

謝辞

本研究は、東北大学 飛翔型「科学者の卵養成講座 (JST グローバルサイエンスキャンパス)」および東北大学 探求型「科学者の卵養成講座 (JST グローバルサイエンスキャンパス)」の支援のもとで実施された。*oni2-1*, ND4073 (*oni2-3*), ND4084 (*oni2-4*) は *Tos17* ミュータントパネルから分譲された系統である。

引用及び参考文献

- Aarts MGM, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A (1995) Molecular characterization of the *CER1* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7, 2115-2127
- Abe M, Katsumata H, Komeda Y, Takahashi T (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* 130, 635-643
- Akiba T, Hibara K, Kimura F, Tsuda K, Shibata K, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, Itoh J-I, Ito Y (2014) Organ fusion and defective shoot development in *oni3* mutants of rice. *Plant Cell Physiol* 55, 42-51
- Bernard A, Domergue F, Pascal Stephanie, Jetter R, Renne C, Faure J-D, Haslam RP, Napier J, Lessire R, Joubes J (2012)

- Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell* 24, 3106-3118
- Koornneef M, Hanhart CJ, Thiel F (1989) A genetic and phenotypic description of *Eceriferum* (*cer*) mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Hered* 80, 118-122
- Fujita M, Horiuchi Y, Ueda Y, Mizuta Y, Kubo T, Yano K, Yamaki S, Tsuda K, Nagata T, Niihama M, Kato H, Kikuchi S, Hamada K, Mochizuki T, Ishimizu T, Iwai H, Tsutsumi N, Kurata N (2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol* 51, 2060-2081
- Gallavotti A, Yang Y, Schmidt RJ, Jackson D (2008) The relationship between auxin transport and maize branching. *Plant Physiol* 147, 1913-1923
- Ishikawa T, Ito Y, Kawai-Yamada M (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *Plant J* 88, 681-693
- Ito M, Sentoku N, Nishimura A, Hong S-K, Sato Y, Matsuoka M (2002) Position dependent expression of GL2-type homeobox gene, *Roc1*: significance for protoderm differentiation and radial pattern formation in early rice embryogenesis. *Plant J* 29, 497-507
- Ito Y, Kimura F, Hirakata K, Tsuda K, Takasugi T, Eiguchi M, Nakagawa K, Kurata N (2011) Fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant J* 66, 680-688
- Jain M, Kaur N, Garg R, Thakur JK, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genomics* 6, 47-59
- Miyashita Y, Takasugi T, Ito Y (2010) Identification and expression analysis of PIN genes in rice. *Plant Sci* 178, 424-428
- Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446, 199-202
- Takada S, Takada N, Yoshida A (2013) *ATML1* promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots. *Development* 140, 1919-1923
- Takasugi T, Ito Y (2011) Altered expression of auxin-related genes in the fatty acid elongase mutant *onil* of rice. *Plant Signal Behav* 6, 887-888
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Mikio Nishimura, Machida C, Machida Y (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* 128, 4681-4689
- Tanaka H, Watanabe M, Sasabe M, Hiroe T, Tanaka T, Tsukaya H, Ikezaki M, Machida C, Machida Y (2007) Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in *Arabidopsis*. *Development* 134, 1643-1652
- Tanaka H, Watanabe M, Watanabe D, Tanaka T, Machida C, Machida Y (2002) *ACR4*, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana*, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis. *Plant Cell Physiol* 43, 419-428
- Tsuda K, Akiba T, Kimura F, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, Ito Y (2013) ONION2 fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant Cell Physiol* 54, 209-217